Version n°1 du 21072011

Mode opératoire :
Recherche de
Vibrio Cholerae dans l'environnement hydrique

Rédacteurs :

Dr SUDRE Bertrand (Chercheur Affilié à l'Université de Franche-Comté)
Mr LE GOFF Nicolas (Fondation Veolia Environnement)

Partenaires de mise en œuvre :

Action Contre la Faim (DUNOYER Jessica)
Fondation Veolia Environnement (HAASER Franck – LE GOFF Nicolas)
Laboratoire Farcha (……………)

Relecteurs externes :

Mr MOSQUERON Luc (VEOLIA Environnement Recherche et Innovation)

COORDONNEES DES PARTICIPANTS

Nom Prénom	Institution	Position	adresse email	téléphone
Jessica DUNOYER	ACF-F	PM Wash choléra cap	washurgcap@td.missions-acf.org	+235 62 42 61 73
Bertrand Sudre	UMR chrono environement, Besançon	MD PHD	bsudre@free.fr	+46 700 752 105
DIGUIMBAYE-DJAIBE COLETTE	LRVZ	Directrice adj.	Diguimbayedjaibe.c@gmail.com	+235 66 29 57 34
NGANDOLO BONGO NARE	LRVZ	Chef de Service BACTERIOLOGIE Recherches et Diagnostics	Bongo_nov@yahoo.fr	+235 66 23 05 24
ABAKAR NAMINOU	LRVZ	Responsable de l'Unité MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE	naminoumba@yahoo.fr	+235 66 99 99 41
NDILASSOUM NELOUM LUCIE	LRVZ	Point focal ANALYSE D'EAU	ndilassoumlucie@yahoo.fr	+235 66 83 10 91
HAASER FRANCK	Fondation Veolia		Franck.HAASER@veolia.com	
LEGOFF NICOLAS	Fondation Veolia		nicolas.le-goff@veolia.com	+33(0)1 55 23 42 25 +33(0)6 10 37 30 17

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

1. Objectifs et résultats de l'étude

1.1. Contexte

Les épidémies de choléra sont récurrentes dans les pays du bassin du lac Tchad, en particulier depuis une vingtaine d'années. Les sources de contamination et les modes de transmission sont encore mal compris, malgré les hypothèses proposées dès les années soixante-dix portant sur la contamination des ressources hydriques et le rôle potentiel de la contamination interhumaine par les aliments partages/eau dans les épidémies de choléra en zone subsahélienne.

En 2010, après l'intervention d'ACF au Tchad, un rapport de capitalisation de l'intervention lors de l épidémie a souligné l importance d un cadre logique d'analyse pour l'identification des voies de transmission pour l'orientation des stratégies de lutte.

En 2011, Action contre La Faim participe à la réponse opérationnelle à l'épidémie de choléra au Tchad.
En parallèle, des actions de réponses de terrain un programme de recherche opérationnelle a été mis en place pour prolonger ce travail de capitalisation qui a débuté en janvier 2011. Un travail collaboratif est réalisé avec l'Université de Franche Comte, pour l'orientation et la rédaction de ce travail pilote en microbiologie de l'environnement, ainsi qu'un soutien opérationnel et technique est apporté par la Fondation Veolia Environnement, dans le cadre de ces travaux pour la Global Alliance Against Cholera (http://www.choleraalliance.org/).
Le rôle de la microbiologie de l'environnement dans la lutte contre le choléra peut apporter des informations pour la prise de décision opérationnelle et assoir ainsi les recommandations sur la prévention du risque de transmission auprès des populations exposées. Il est une partie intégrante d'une approche transversale pour la réponse aux questions de santé publiques.
Ce travail pilote n'a jamais été réalisé au Tchad, et participe au dynamisme des capacités de recherche et l'échange des compétences et d'au sein des laboratoires inclus dans le projet.

1.2. Objectifs

Ce document a pour objectif de présenter une **méthode d'identification et de quantification du vibrion cholérique *Vibrio Cholerae* O1 dans des prélèvements hydriques environnementaux**. Les méthodes proposées sont issues de la bibliographie existante et adaptées au contexte et aux objectifs de l'étude.

Le protocole sera msie en deux étapes : tout d'abord validé en laboratoire avec la participation de plusieurs techniciens d'analyses microbiologiques du laboratoire de Recherche vétérinaire et zoologique de Farcha à Ndjamena, et ensuite mis en application dans une phase pilote a partir de différents prélèvements environnementaux provenant de campagne d'échantillonnage de terrain.

Le but de ce travail est **de valider et d'optimiser le mode de prélèvement et d'analyse** afin de pouvoir établir la présence/l'absence du *Vibrio Cholerae* dans des prélèvements provenant de différents milieux hydriques tels que l'eau de marre, de fleuves au point de puisage, les puits utilisés pour la consommation humaine ou des jarres de conservation de l eau au sein du domicile.

Les résultats attendus sont les suivants :

1.3. Résultat 1 : Validation au laboratoire d'une méthode qualitative et quantitative d'isolement du *Vibrion cholerae*

La validation de ces deux méthodes se fera en plusieurs étapes, comme décrites dans la figure nº 1 ci-dessous. Ces différentes étapes permettront de valider :

- la présence de *Vibrio cholerae* O1 à l'aide de la méthode qualitative (sur des solutions titrées et sur des échantillons prélevés sur le terrain, voir en annexe K).
- valider la méthode quantitative après le calibrage à l'aide de standard Mac Farland et de solutions titrées (**voir annexe** J).

La validation de la méthode quantitative se fera en quatre étapes qui permettront de vérifier :

- la sensibilité et la gamme de mesure,
- la variabilité du comptage,
- l'utilisation d'une méthode d'ensemencement par dépôt de membrane sur la gélose,
- sa faisabilité sur des échantillons de terrain.

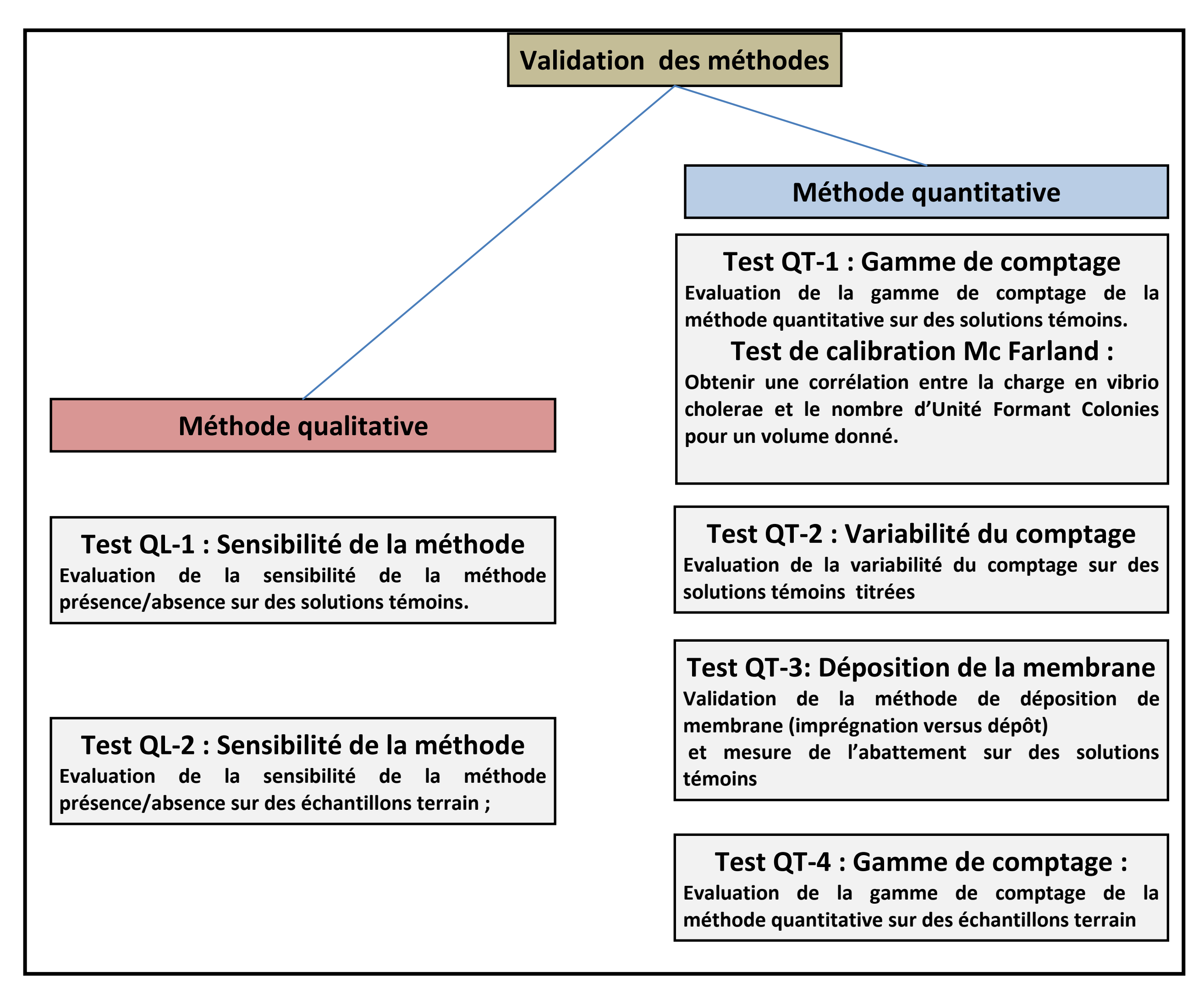


Figure 1: plan de validation des méthodes d'analyses

Le détail de la répartition des différentes solutions titrées et des échantillons terrain est donné dans le tableau de l'annexe h, répartition des consommables.

La validation de ces deux méthodes devra également permettre d'ajuster les temps et durées des différentes étapes d'analyse afin d'optimiser le chronogramme initial définit au chapitre 3.

	Test	But du test	Objectif	Etapes de culture, d'identification et de comptage:	Matériel :
Méthode qualitative	Test QL-1	Valider la méthode de détection présence / absence sur des solutions témoin	Tester la sensibilité	Caractères macroscopiques Caractères microscopiques Etat frais Gram Test oxydase Serotype Galérie API 20 E	1 Solution titrée VC 3 filtres 3 milieu enrichissment 3 TCBS 3 GNA 3 test oxydase 3 galerie API 20 E
Méthode qualitative	TEST QL-2	Valider la méthode de détection présence / absence sur des échantillons terrain	Tester la sensibilité	Caractères macroscopiques Caractères microscopiques Etat frais Gram Test oxydase Serotype Galérie API 20 E	4 échantillons terrain 20 filtres 4 milieu enrichissement (4*50ml) 4 TCBS 12 GNA 4 test oxydase
Méthode quantitative	TEST QT-1	Obtenir une corrélation entre la charge en vibrio cholerae et le nombre d'Unité Formant Colonies pour un volume	Réaliser une courbe de correlation	Réaliser une gamme de solution de VC de concentration croissante, effectuer une comparaison avec des standards Mac Farland après 24h d'incubation, effectuer les filtrations et enrichissements sur TCBS, vérifier les caractères macroscopiques, puis	6 standards Mac Farland 6 solutions titrées 6 menbranes 6 TCBS
Méthode quantitative	TEST QT-1	Evaluation de la gamme de comptage sur des solutions témoins	Tester la gamme de mesure	Comptage des colonies sur filtre après dépôt sur TCBS Sensibilité et gamme de la méthode 4 solutions de concentrations décroissantes (? 10-2 à 10-8 = concentration ++++ à +)	4 Solution titrée VC 8 filtres 8 boites TCBS
Méthode quantitative	TEST QT-2	Estimation de la variabilité de la méthode sur des échantillons témoins	Tester la variabilité du comptage	Permettra d'avoir un première estimation de la variabilité de la méthode pour deux concentrations connues pour un volume donnée de 100ml	2 Solution titrée VC 8 filtres 8 boites TCBS
Méthode quantitative	TEST QT-3	Méthode de dépôt du substrat / % d'abattement	Tester la méthode de déposition et l'abattement	Connaitre le pourcentage de recueil sur filtre avec la méthode d'apposition sur milieu gélosé. - 4 empruntes successives (% de recueil) - 1 évaluation de la variation de la	1 Solution titrée VC 4 filtres 16 boites TCBS
Méthode quantitative	TEST QT-4	Evaluation de la méthode quantitative sur des échantillons terrain	Tester la gamme de mesure	Comptage des colonies sur filtre après dépôt sur TCBS Sensibilité et gamme de la méthode 4 échantillons de provenance différentes	4 échantillons terrain (Mare, Puits, Point de stockage, Rivière) 20 filtres

Tableau 1: Description des étapes de validation

1.4. Résultats 2 : Formation du personnel

La validation de ces deux méthodes sera effectuée dans le Laboratoire de Recherche vétérinaire et zoologique de Farcha à Ndjamena (LRVZ).
Cette étape de validation des techniciens microbiologistes du Laboratoire de Référence de Ndjamena (Microbiologie humaine) et du LRVZ (Microbiologie environnementale et animale) permettra de réaliser le protocole et d'optimiser sa mise en place.
La formation permettra aux techniciens (3 binômes) de tester les deux méthodes comme indiqué dans le programme d'analyse de l'annexe L.

1.5. Résultats 3 : Recherche de la présence du *V.cholerae* dans l'environnement

Les deux étapes précédentes seront ensuite suivies d'une campagne de prélèvements de terrain pour la recherche et la quantification, qui permettra d'approfondir les connaissances sur la transmission hydrique.

La réalisation de la méthode quantitative (pour les échantillons positifs par la méthode qualitative) est basée sur duplicate de chaque prélèvement, pour lesquels le codage des duplicates sera important, la conservation durant la réalisation de la méthode qualitative (température, ambiante/ abris de la lumière/ volume

Sur l'ensemble du projet, 52 échantillons seront analysés répartis comme suit :

site	nbr site	N échantillons	n campagne	n prélèvement
Marre	4	3	1	12
Fleuve / Lac	4	3	1	12
Puits	4	2	1	8
Jarres	5	2	2	20
somme ANALYSE				**52**

Tableau 2: projection indicative des analyses à réaliser

Ce tableau correspond à une projection indicative des analyses à réaliser. Une adaptation à l'épidémiologie de la maladie sur le terrain peut amener à une modification du type et du nombre de prélèvements.

2. Schéma de principe des deux méthodes

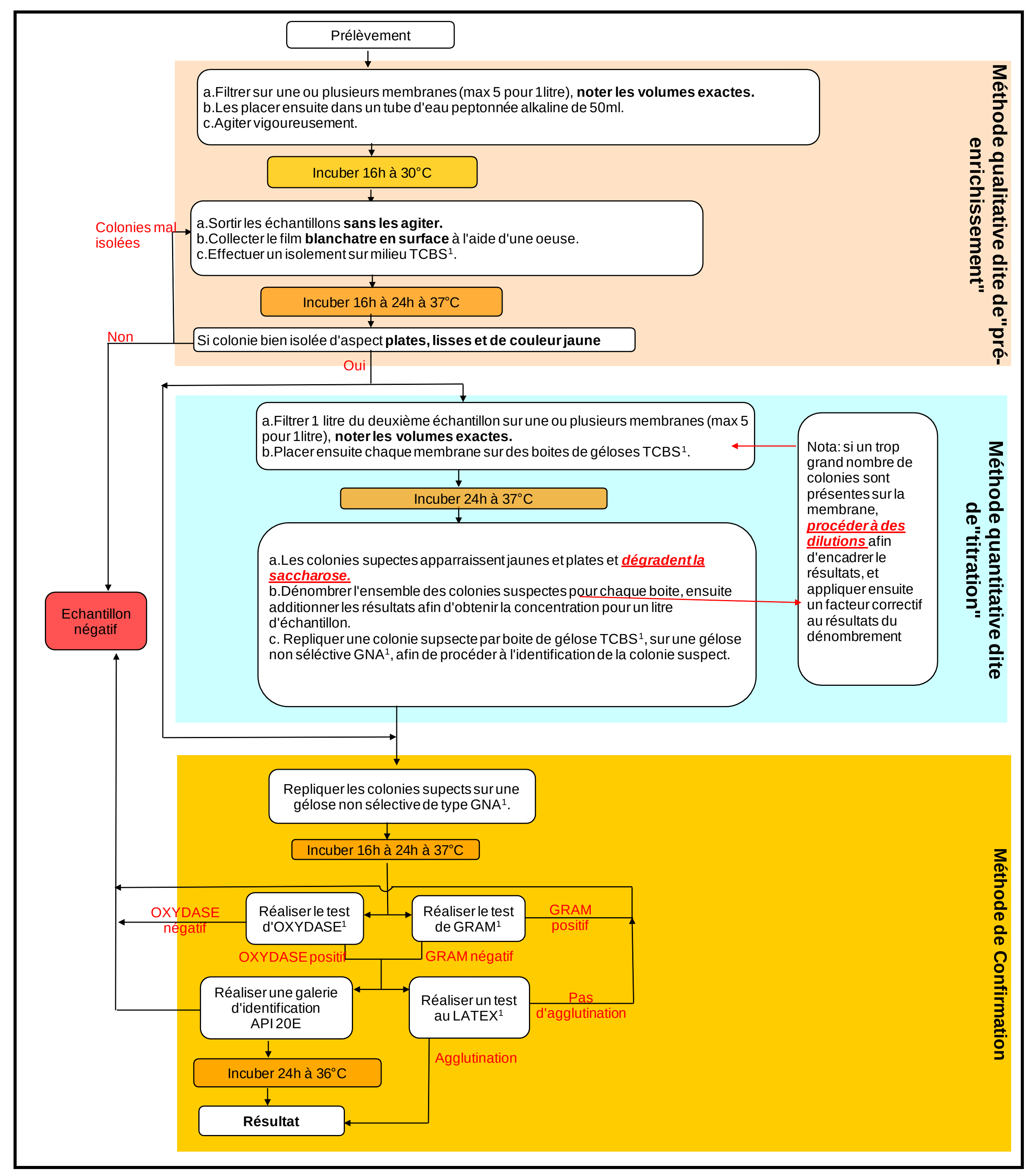


Figure 2: Schéma méthodologique

<u>**Les modes opératoires sont présentés en annexe.**</u>

3. Prélèvement de terrain de type hydrique

Bonne pratique de prélèvement :

- Le prélever doit se laver les mains avant chaque prélèvement et utiliser des gants jetables.
- Réaliser le prélèvement d'eau en duplicate (2 fois 1 litre en bouteille PVC ou plastique stérile).
- Noter sur le terrain le lieu, l'heure, la provenance (nom du lieu, village le plus proche et coordonnées GPS si besoin /
- Etiqueter les bouteilles avec les codages préparés au laboratoire (prélèvements 1= P1 et prélèvement 2 =P2)
- Un premier litre sera analysé dès réception au laboratoire ou dans la journée (P1), l'autre (P2) sera stocké **fermé** en **chambre froide à 4°C** et à **l'abri de la lumière.**

- Les récipients doivent être autoclavable, afin de pouvoir être stérilisé ou à usage unique. À défaut, utilisé des bouteilles d'eau minérale non usagées.

Transport et conservation :

- Les échantillons doivent être transportés dans une glacière fermée (à l'abri de la lumière) contenant des pains de glace afin de maintenir une température inférieure à 10°C et arriver au laboratoire moins de 12h après prélèvement.

- La glacière de transport doit être lavée et désinfectée après chaque journée d'utilisation (solution de nettoyage à 0.1% en chlore : dissoudre 1.5 gr de Hypochlorite de Calcium dans un litre d'eau).

- Une traçabilité des échantillons devra être mise en place systématiquement (fiche de suivi par échantillon comportant le lieu, la date, l'heure de prélèvement ainsi que le nom du préleveur) et l'ensemble des informations devra être reporté sur un fichier regroupant l'ensemble des informations.

Ces informations doivent être consignées dans un cahier de laboratoire,
Un prélèvement = une page

4. Mode opératoire pour l'isolement du Vibrio Cholerae dans des échantillons d'eau

4.1. Méthode qualitative

4.1.1. Filtration

- Noter la date sur le cahier de paillasse, le codage, le type d échantillon et la provenance + initiale du technicien sur la page dédiée à l'échantillon
- Noter les paramètres physico chimique (pH, Turbidité, salinité, température)
- Filtrer un litre d'échantillon sur des membranes de porosité 0.22 µm. Si l'échantillon est turbide, il est possible d'utiliser plusieurs membranes afin de pouvoir filtrer 1l sur au maximum de 5 membranes.
- Placer les membranes enroulées dans 50 ml d'eau pep tonnée alcaline puis agiter vigoureusement.
- Incuber pendant 16h à 30°C

4.1.2. Ensemencement

- Sortir les échantillons de l'étuve **sans les agiter (!).** En effet, les Vibrions se situent en surface **le surnageant est un film blanchâtre à la surface** de la colonne de liquide.
- Collecter le développement en surface à l'aide d'une oeuse stérile
- procéder à un isolement en stries sur une boite de gélose TCBS (il est préférable d'avoir des boites de 90 mm de diamètre car cela permet de meilleur isolement).

4.1.3. Lecture

,

- État frais : Aspect monomorphe, vol de moucherons du au flagelle polaire
- Coloration de GRAM :=négatif, flore monomorphe, de bacilles fins, en virgules
- Sont considérées comme colonies suspectes les colonies plates, lisses et de couleur jaune faisant fermenter le saccharose[1]. Si les colonies ne sont pas correctement isolées, procéder à un nouvel isolement sur gélose sélective TCBS.

Pour les tests de confirmation, il faut absolument travailler sur des souches pures.

- À ce moment la filtration et mise en culture pour la méthode quantitative pour les échantillons suspectés d'être positif.

4.1.4. Confirmation

- Repiquer **3 colonies suspectes** sur des géloses non sélectives de type GNA[2] pour identification
- Incuber 16 à 24h à 37°C.
- Après incubation, réaliser test à l'oxydase et la coloration de Gram[3].

---

[1] Ce caractère biochimique discriminant avec l'ensemble des autres vibrio (à l'exception de Vibrio Mimicus) ne sera pas testé

[2] Voir document en annexe

[3] Voir document en annexe

Si les tests d'oxydase et de coloration de Gram sont concluants, le test de mobilité et le test au latex sont réalisés .âpres le test au latex Si les résultats de sont pas concluant faire une galerie API 20E.

- -Test au Latex

Une fois les *vibrio cholerae* identifié, il convient, de vérifier leur appartenance au serogroupe (O1 ou 139) à l'aide du texte Latex, seul sérogroupe responsable du choléra chez l'homme.

4.2. Méthode quantitative

L'analyse quantitative sera réalisée sur le deuxième échantillon (qui sera stocké en chambre froide), lorsque le premier échantillon, analysé par la méthode qualitative, apportera un résultat positif au premier ensemencement.

4.2.1. Filtration

- Filtrer un litre d'échantillon sur des membranes de porosité **0.22µm**. Si l'échantillon est turbide, il est possible d'utiliser plusieurs membranes afin de pouvoir filtrer 1 litre. Toutefois, un nombre maximum de 5 membranes sera utilisé, il est donc important de reporter sur le cahier de paillasse le volume exact filtré afin de pouvoir exprimer ensuite le résultat en nombre de colonies pour 100 ml.
- Chaque membrane devra être mise en culture indépendamment sur des boites de gélose TCBS[4] de 55mm
- Incuber à 37°C pendant 24h.

4.2.2. Lecture

- Les colonies suspectes apparaissent jaunes et plates, avec un halo.
- Dénombrer les colonies suspectes sur chaque boite et additionnez les résultats afin de connaitre la concentration en vibrion présent dans le volume filtré. Exprimer ensuite le résultat en nombre de colonies pour 100 ml (noter le comptage brutes et le nombre d'UFC pour 100 ml)

Si un trop grand nombre de bactéries sont présentes sur les membranes rendant leur lecture impossible, réaliser des dilutions selon le schéma ci-dessous :

Pur	*1 \ 10*	*1 \ 100*	*1 \ 1000*
100 mL d'échantillon	10 mL	1 mL	0,1 mL

Tableau 3: Tableau des dilutions

Sélectionner trois volumes en fonction de la charge bactérienne observée lors de la première filtration.

4.2.3. Confirmation

- Repiquer les colonies suspectes sur une gélose non sélective type GNA[5].
- Incuber 24h à 37°C.

[4] Voir document en annexe
[5] Voir document en annexe

- Après incubation, réaliser l'oxydase et la coloration de Gram.
- Si les tests précédents sont concluants réaliser un test au latex, puis une galerie API 20E par échantillon

4.2.4. Test au Latex

Une fois les *vibrio cholerae* identifié, il convient, de vérifier leur appartenance au serogroupe O1 à l'aide du texte Latex.

4.2.5. Conservation des souches positives

Les souches de *vibrio cholerae* isolées à partir des échantillons environnementaux peuvent être conservées sur des boites de **gélose GNA** pour des conservations à court terme ou congelé à -80°C (dans un bouillon à 10% de glycérol) pour une conservation à long terme.
Une alternative dans la conservation des collections de souche pure est l'utilisation de gélose de conservation tubes de **gélose conservation** (**BIORAD** 63683) à la température ambiante et à l'abri de la lumière.

5. Bibliographie

- *Toxigenic Vibrio cholera in the aquatic environnement – Alam. AEM. (2006).*
- *Laboratory Methods for theDiagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera - Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia (1999).*
- *Detection, Isolation, and Identification of Vibrio cholerae from the Environment - Anwar Huq, Christopher Grim, Rita R. Colwell, and G. Balakrish Nair - Current Protocols in Microbiology (2006)*
- *Protocole AFSSA pour l'identification du Vibrio Cholera dans les produits de la mer – (fév. 2010)*
- *Laboratory methods for the diagnosis of V.cholerae - Centers for Disease Control and Prevention Atlanta (1999)*
- *Manuel de sécurité biologique en laboratoire – Organisation mondiale de la santé – 3e édition (2005)*
- *Vibrio cholerae in the Environment: A Simple Method for Reliable Identification of the Species- S. Baron, S. Chevalier, and J. Lesne (2007)*
- *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des Vibrio spp. potentiellement entéropathogènes - norme ISO_TS_21872-1;2007(F)*
- *Environmental reservoirs of Vibrio cholerae and their role in cholera- Luigi Vezzulli, Carla Pruzzo, Anwar Huq and Rita R. Colwell – (2009)*
- *Le diagnostic bactériologique du choléra - Marie-Laure Quilici – Revue francophone des laboratoires (Avril 2011)*

Annexes

a. Gélose sélective type TCBS

DOMAINE D'UTILISATION

La gélose au Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose (TCBS) constitue un milieu sélectif destiné à l'isolement de Vibrio cholerae et des autres vibrions entéropathogènes (en particulier Vibrio parahaemolyticus) dans les poissons, les produits de la mer et les autres prélèvements biologiques d'origine animale.

HISTORIQUE

La formule d'origine, mise au point par Nakanishi, a été modifiée ultérieurement par Kobayashy *et al*. pour l'isolement sélectif des *Vibrio* pathogènes.

PRINCIPES

- Les concentrations élevées en thiosulfate et en citrate de sodium ainsi que la forte alcalinité du milieu **inhibent fortement la croissance des entérobactéries.**
- La bile de boeuf et le chlorure de sodium ralentissent la culture des entérocoques et inhibent le développement des germes à Gram positif.
- Par acidification du milieu, résultant de la fermentation du saccharose, les *Vibrio* provoquent le virage au jaune de l'indicateur au thymol et au bleu de bromothymol.
- À partir du thiosulfate, qui constitue une source de soufre, la production de sulfure d'hydrogène est révélée en présence de citrate ferrique. Tous les *Vibrio* sont H2S-négatifs.

MODE D'EMPLOI

- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47°C.
- Couler en boîtes de Petri stériles.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.
- Ensemencer l'inoculum par étalement en surface.
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures, à l'abri de la lumière.
- **sortir les boites en avance**

LECTURE

Les colonies présentent les aspects suivants :

Caractéristiques	Microorganismes
Colonies jaunes, planes, de 2 à 3 mm de diamètre	*Vibrio cholerae*
Colonies jaunes, de grandes tailles	*Vibrio alginolyticus*
Colonies jaunes ou translucides	*Vibrio fluvialis, Vibrio vulnificus*
Colonies incolores à centre vert	*Vibrio parahaemolyticus*
Colonies bleues	*Pseudomonas, Aeromonas*
Colonies minuscules, transparentes	Entérobactériacées ou autres



FORMULE TYPE

(Pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone ....10,0 g
- Extrait autolytique de levure...5,0 g
- Saccharose ....20,0 g
- Bile de boeuf bactériologique ....5,0 g
- Cholate de sodium ....3,0 g
- Citrate de sodium...10,0 g
- Thiosulfate de sodium..10,0 g
- Chlorure de sodium..10,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal ....1,0 g
- Bleu de bromothymol ....40,0 mg
- Bleu de thymol ....40,0 mg
- Agar agar bactériologique..14,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 8,6 ± 0,2.

b. Gélose non sélective type GNA

NUTRITIVE (GELOSE)

Milieu d'usage courant qui peut être enrichi avec 10 % de sang ou autres liquides biologiques.

COMPOSITION (grammes/litre)

Extrait de viande de bœuf	1,0g
Extrait de levure	2,0g
Peptone	5,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Agar	15,0g

pH 7,4 ± 0,2

500 grammes permettent de préparer 17,9 litres de milieu.

PREPARATION
Verser 28 g de poudre dans un litre d'eau distillée et porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

DESCRIPTION
La gélose nutritive sert de milieu de culture de base pour repiquer les souches à conserver, ou pour vérifier la pureté des subcultures avant d'effectuer des tests biochimiques et sérologiques. Ce milieu sous forme semi-solide est utilisé en tubes inclinés (culot et pente) pour conserver des souches de référence.1
La gélose nutritive contient 1,5 % d'Agar et peut être supplémentée si nécessaire avec 10 % de sang ou autres liquides biologiques. Ce milieu utilisé sans additif convient à la culture des germes qui ne présentent pas d'exigence nutritive particulière.
Voir aussi la Gélose de base au sang n°2 (CM0271) pour un milieu plus riche en éléments nutritifs.

CONSERVATION
Conserver le milieu déshydraté à 10–25°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon. Conserver le milieu prêt à l'emploi à 2–8°C.

c. Coloration de Gram

MATERIEL
LAMES, COLORANTS, EVIERS ET BAC EN VERRE.

MODE OPERATOIRE

- Réaliser un frottis ou un étalement
- Fixer la préparation à la flamme (normalement on fixe avec de l'alcool et on flambe), sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.
- Immerger les lames dans la solution de Cristal violet pendant 1mm.
- Lavage à l'eau en transvasant les lames
- Immerger les lames dans du Lugol en les agitant
- Laver à nouveau à l'eau
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une **dizaine de secondes** dans le décolorant.
- Laver à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air.
- Observer à l'objectif X100, en immersion avec de l'huile.

RESULTAT
LES BACTERIES GRAM + SONT COLOREES EN VIOLET FONCE, LES BACTERIES GRAM - SONT COLOREES EN ROSE, CECI ETANT DU A UNE DIFFERENCE DE COMPOSITION DE LA PAROI LORSQUE L'ON COLORE PEU DE LAMES, PLUTOT QUE D'IMMERGER LES PREPARATIONS, ON PEU LES RECOUVRIR DE COLORANTS. LE DECOLORANT DOIT ETRE CHANGE CHAQUE JOUR.

RISQUES D'ERREURS

FAUX GRAM (+) :

- Étalement trop épais,
- Dépôt de colorant dans le flacon de violet de gentiane : filtrer le colorant pour y remédier,
- Solution iodée de Gram mal égoutté,
- décolorant laissé trop peu de temps (globalement, mieux vaut trop que pas assez.
- Solution de safranine laissée très longtemps (plus d'une minute).

FAUX GRAM (-) :

- Solution iodée de Gram laissée trop peu de temps,
- Décolorant laissé trop longtemps et mal rincé,

REACTIFS

1- VIOLET DE GENTIANE - ADAPTATION DE HUCKER :

SOLUTION A :

- Violet de gentiane 2 g
- Alcool à 95° 20 ml

SOLUTION B :

- Oxalate d'ammonium : 0,8 g
- Eau distillée 80 ml

MELANGER LES SOLUTIONS A ET B, LAISSER REPOSER 24 HEURES AVANT L'EMPLOI, VERSER A TRAVERS UN PAPIER FILTRE DANS UN FLACON.

2- SOLUTION IODEE DE GRAM

- Iode 1 g
- Iodure de potassium 2 g
- Eau distillée 300 ml

DISSOUDRE D'ABORD L'IODURE DE POTASSIUM DANS ENVIRON 30 ML D'EAU DISTILLEE, AJOUTER L'IODE ET MELANGER JUSQU'A DISSOLUTION. AJOUTER LE RESTE D'EAU DISTILLEE, MELANGER.
CONSERVER DANS UN FLACON EN VERRE BRUN OU EN PLASTIQUE OPAQUE (A L'ABRI DE LA LUMIERE).

3- SOLUTION DE SAFRANINE

SOLUTION A :

- Safranine O 2,5 g
- Alcool à 95° qsp 100 ml

SOLUTION A BIS :

- Solution A 10 ml
- Eau distillée 90 ml

4- DECOLORANT

MELANGER A PARTIES EGALE ALCOOL A 95 ° ET ACETONE. LE MELANGE EST A FAIRE EXTEMPORANEMENT.

d. Test d'oxydase

PRINCIPE

-. Il permet de mettre en évidence une enzyme : **la phénylène diamine oxydase** des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : **le N diméthyl paraphénylène diamine**.

MODE OPERATOIRE

Le réactif peut se trouver sous deux formes :

- soit en solution : sur une lame de verre, déposer un carré de papier filtre et l'imbiber d'une solution fraîchement préparée de réactif,
- soit sous la forme d'un disque pré-imprégné par le réactif.

Dans les deux cas, **écraser avec une effilure de pipette Pasteur une colonie de germes à étudier sur ce papier (instrument n'oxydant pas le réactif).**

RESULTAT

- Si la colonie prend une teinte rose, violette. Le germe possède une oxydase : le test est positif.
- Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif.




À gauche test négatif, à droite test positif

e. Test au latex

REACTIFS

Antisérums polyvalents pour le sérogroupe O1 et O139
lames de microscope en verre

MODE OPERATOIRE

1. Ajouter deux gouttes séparées de PBS à une lame de microscope.
2. Ajouter une anse de croissance fraîche à partir d'une sous-culture de 6 à 16 heures de V. *cholerae* sur milieu non sélectif à chaque goutte, et mélanger.
3. Ajouter une goutte de taille égale du groupe O1 antisérum polyvalent à l'une des gouttes.
4. Mélanger la suspension antisérum-culture en inclinant la lame d'avant en arrière. Déterminer s'il y a une réaction (d'agglutination) en 0,5 à 1 min, ce qui indique un résultat positif.
L'auto agglutination, c'est à dire, une agglutination dans la solution saline sans sérum, est indicative d'un morphotype qui ne peut être saisi par des antisérums. Pour le typage des colonies avec morphotype bruts, voir le protocole joint au kit.
5. Test des colonies n'étant pas du sérogroupe O1 en utilisant l'antisérum O139, et en répétant les étapes 1 à 4, mais son remplacement par un antisérum anti-O139 pour anti-O1 antisérum est possible

f. Ensemencement en strie

Source : *http://www.commentfaiton.com/fiche/voir/10003/comment_ensemencer_un_milieu_solide_par_la_methode_des_stries_d_isolement)*

DESINFECTEZ TOUT D'ABORD A L'ALCOOL VOTRE PLAN DE TRAVAIL. + CHLORE

ALLUMEZ LE BEC BUNSEN EN PRENANT SOIN D'OBTENIR UNE FLAMME BLEUE, AFIN DE STERILISER L'AIR ALENTOUR DANS UN RAYON DE 10 CENTIMETRES.

VOUS NE DEVEZ PAS VOUS ECARTER AU-DELA DE CE SECTEUR, FAUTE DE QUOI VOUS RISQUERIEZ DE CONTAMINER VOTRE BOITE DE PETRI.

RAPPELEZ-VOUS QUE VOUS AVEZ MIS DE L'ALCOOL SUR VOTRE PLAN DE TRAVAIL ...

LA BOITE DE PETRI A TEMPERATURE AMBIANTE TOUT EN LA LAISSANT FERMEE POUR LE MOMENT.

ESSAYEZ LE PLUS POSSIBLE DE NE PAS LA LAISSER OUVERTE DANS LE BUT D'EVITER TOUTE CONTAMINATION INDESIRABLE.
INSCRIVEZ SUR LE COTE OU LE FOND DE LA BOITE A QUOI CORRESPOND LE CONTENU (NOM ECHANTILLON, CONCENTRATION, DATE ...).

PASSEZ L'ANSE DANS LA FLAMME DU BEC BUNSEN JUSQU'A CE QU'ELLE DEVIENNE INCANDESCENTE, DANS LE BUT DE LA STERILISER.

PATIENTEZ QUELQUES SECONDES LE TEMPS QUE LA TEMPERATURE DIMINUE, PUIS PLONGEZ L'ANSE DANS LA SOLUTION BACTERIENNE.
FAITES EN SORTE QU'UNE GOUTTELETTE RESTE "PRISONNIERE" DE LA BOUCLE DE L'ANSE. C'EST CE VOLUME QUE VOUS ALLEZ ENSEMENCER SUR VOTRE MILIEU.

OUVREZ LA BOITE DE PETRI, ET DIVISEZ MENTALEMENT CELLE-CI EN 3 PARTIES EGALES.

1

DEPOSEZ LA SOLUTION MICROBIENNE AVEC L'ANSE DANS LA 1ER TIERS DE LA BOITE EN EFFECTUANT DES STRIES DANS UN MOUVEMENT DE VA-ET-VIENT, EN PRENANT SOIN DE NE PAS TRAVERSER, CREUSER OU ARRACHER LE MILIEU.
VOUS DEVEZ LA DEPOSER UNIQUEMENT EN SURFACE.

REFERMEZ LA BOITE DE PETRI, ET PLONGEZ A NOUVEAU L'ANSE DANS LA FLAMME DU BEC BUNSEN JUSQU'A L'INCANDESCENCE.
PATIENTEZ QUELQUES SECONDES, LE TEMPS QU'ELLE REFROIDISSE.

ROUVREZ VOTRE BOITE DE PETRI, ET EFFECTUEZ LE MEME MOUVEMENT DE STRIES DANS LE 2ND TIERS DE LA BOITE, EN PRENANT SOIN DE REPASSER SUR L'EXTREMITE DE LA DERNIERE STRIE EFFECTUEE PRECEDEMMENT SUR LE 1ER TIERS, ET CELA DANS LE BUT DE "RECUPERER" SUR L'ANSE DE LA SOLUTION (VOTRE ANSE ETANT STERILE A LA SUITE DE SON PASSAGE SOUS LA FLAMME, FAIRE DES STRIES SANS RECUPERER DE LA SOLUTION DEJA PRESENTE SUR LA BOITE SERAIT INUTILE).

REFERMEZ LA BOITE DE PETRI.

PLONGEZ A NOUVEAU L'ANSE DANS LA FLAMME DU BEC JUSQU'A INCANDESCENCE. PATIENTEZ QUELQUES SECONDES LE TEMPS QU'ELLE REFROIDISSE.

COMME PRECEDEMMENT, FAITES DES STRIES DANS LE 3E ET DERNIER TIERS DE VOTRE BOITE, EN PRENANT GRAND SOIN DE RECUPERER DE LA SOLUTION EN REPASSANT UNE SEULE FOIS SUR L'EXTREMITE DE LA DERNIERE STRIE EFFECTUEE DANS LE 2ND TIERS.

UNE FOIS VOUS STRIES TERMINEES, REFERMEZ LA BOITE DE PETRI. PLONGEZ L'ANSE DANS LA FLAMME DU BEC BUNSEN JUSQU'A SON INCANDESCENCE, ET POSEZ-LA SUR LE PRISME.

VOTRE MILIEU EST AINSI ENSEMENCE AVEC LA SOLUTION BACTERIENNE.

INCUBEZ VOTRE BOITE.

LES RESULTATS DEVRAIENT MONTRER DES COLONIES MULTIPLES ET REGROUPEES SUR LE PASSAGE DES STRIES DU 1ER TIERS DE LA BOITE. PUIS, DANS LE 2ND TIERS, ELLES DEVRAIENT ETRE PLUS ESPACEES ET DONC MOINS NOMBREUSES. LE DERNIER TIERS DEVRAIT ENFIN LAISSER APPARAITRE DES COLONIES ISOLEES, ET PURES (NE CONTENANT QU'UN SEUL TYPE DE BACTERIE).

CES COLONIES DE BACTERIES PURES POURRONT PAR LA SUITE ETRE REPIQUEES POUR UNE ANALYSE PLUS POUSSEE.

g. Tableau des consommables

			Validation méthodes									Analyses environnementales		
Test		Total	Méthode qualitative			Méthode quantitative							Analyse de terrain (prelevements)	
			Total	Test QL-1	Test QL-2	Total	Test QT-1		Test QT-2	Test QT-3	Test QT-4	Total	Qualitatif	Quantitatif
	Bouteille 1,5 litre	**8**	8		8	8					8	120	120	
	échantillon terrain	**4**	4		4	4					4	72	60	12
	Standard Mac Farland							6						
	solution titrée	**14**	3	3		11	4	4	2	1				
Enrichissement	**EPA (pH 8,2 à ajuster avec NaOH)** peptone (20 g) chlorure de sodium (5g) *distillée stérile (stériliser 20mn à 120°C)*	***litres***											3000	
	Membrane (0, 22 µm / 47 mm) / échantillon ou solution titrée			1	5		2	1	4	4	5		5	5
	Total membrane	**427**	23	3	20	44	8	4	8	4	20	360	300	60
	Tube de coning stérile (plastique) (verre ?) avec EPHA tube 50 ml EPHA	**67**	7	3	4							60	60	
Ensemensement	Surnageant boite de petri (90 mm) TCBS	**67**	7	3	4							60	60	
	Boite de petri (50 mm) avec milieu TCBS	**116**				56	8	4	8	16	20	60		60
Confirmation	Colonnies représentatives (colonnies jaunes) (1.1/1.2/1.3)			3	3						3		3	*(compter toutes les colonnies caracteristiques / isolement 1)* **3**
	Boite de petri (90 mm) GNA	**441**	21	9	12	60					60	360	180	180
	Préparation à l'état frais (Petits bâtonnets recourbés avec mobilité en flèche) / lame sous microscope												180	180
	Oxydase (sur PCA uniquement)	**395**	15	3	12	20					20	360	180	180
	Gram (petits bâtonnets recourbés à Gram négatif)	**395**	15	3	12	20					20	360	180	180
	Latex	**105**	13	1	12	20					20	72	60	12
	API 20 E	**89**	13	1	12	4					4	72	60	12

h. Laboratoire de confinement : sécurité biologique niveau 2

GROUPE DE RISQUE	NIVEAU DE SÉCURITÉ	TYPE DE LABORATOIRE	PRATIQUES DE PABORATOIRE	APPAREILLAGE DE SÉCURITÉ
1	De base – niveau de sécurité biologique 1	Enseignement de base	BTM	Aucun; paillasse sans protection
2	De base – niveau de sécurité biologique 2	Services de santé primaires; laboratoire d'analyses ou de recherche	BTM et vêtements protecteurs, logo de risque biologique	Paillasse sans protection et ESB contre le risque d'aérosols
3	Confinement – niveau de sécurité biologique 3	Diagnostic spécialisé, recherche	Comme niveau 2, plus vêtements spéciaux, accès réglementé et flux d'air dirigé	ESB ou autres moyens de confinement primaire pour l'ensemble des activités
4	Confinement à haute sécurité – niveau de sécurité biologique 4	Manipulation de germes pathogènes dangereux	Comme niveau 3, plus sas à air à l'entrée, douche à la sortie et élimination spécifique des déchets	ESB classe III ou combinaisons pressurisées utilisées avec une ESB classe II , autoclave à deux portes formant sas mural, air filtré

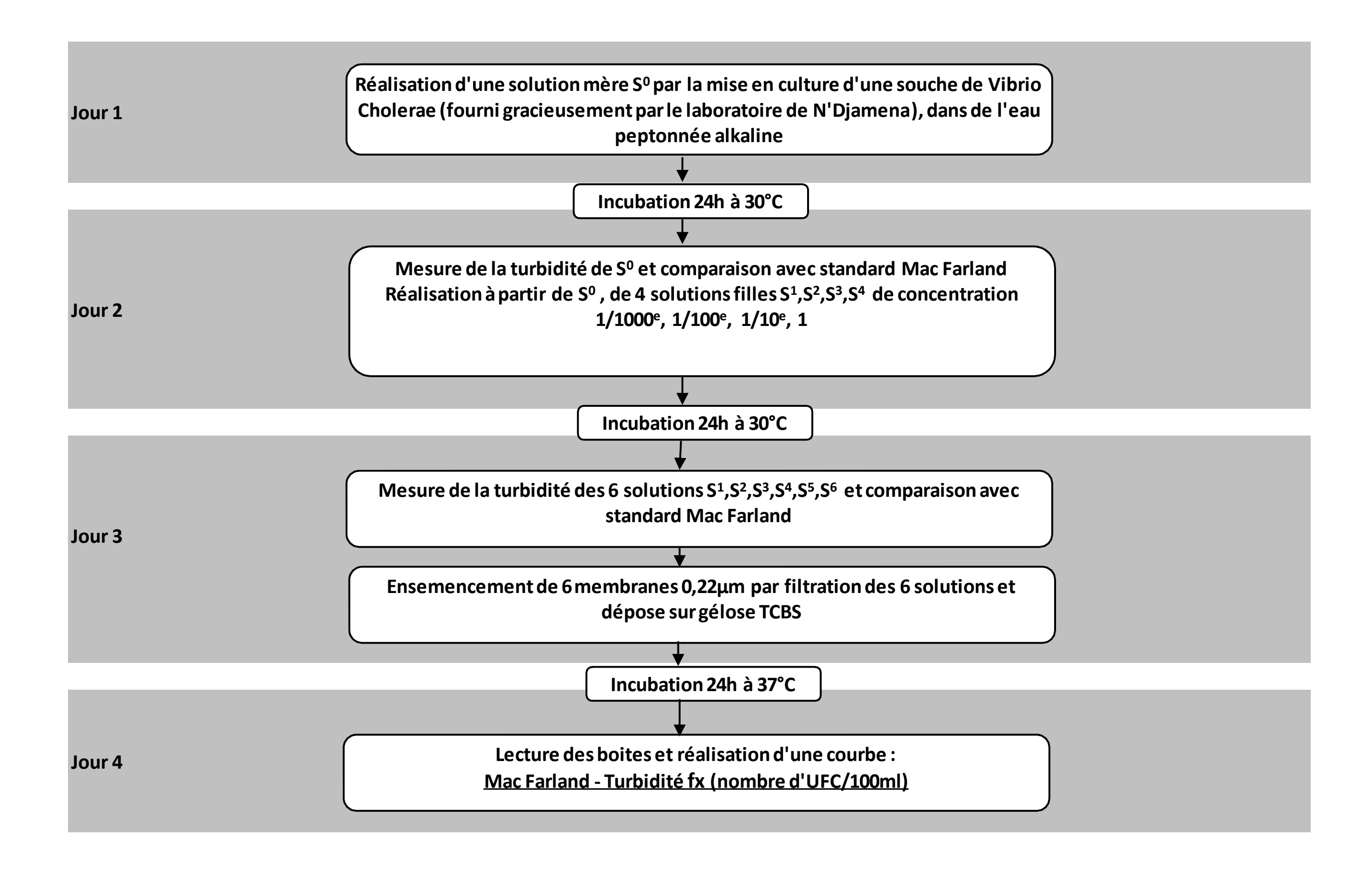
BTM, bonnes techniques microbiologiques; ESB, enceinte de sécurité biologique

i. Liste des équipements

Type	Fournisseur	Référence	Conditionnement	Quantité
FILTRATION				
Boite à pétri 90mm	Grosseron	391-1505	500	2
Boite à pétri 50mm	VWR	391-0895	1620	1
Membrane millipore 47mm, porosité 0,45µ	Millipore	HAWG047S6	boite de 600 x 2	1
Rampe de filtration (avec 3 puits de filtration réutilisable et flambable en inox)	Millipore	XX2504735		1
Pompe à vide		WP6222050		1
EQUIPEMENT LABORATOIRE				
Refrégérateur				2
Bain Marie				1
Incubateur 37°C				1
Incubateur 30°C				1
Groupe electrogène				1
Thermomètre de contrôle pour incubateur				1
Bec Bunsen				2
Gaz				
Autoclave pour destruction et désinfection				1
EQUIPEMENT TERRAIN POUR PRELEVEMENT				
Turbidimètre				1
pHmètre				1
Oxymètre				1
Conductimètre	WTW			1
Flaconnage 1 litre plastique stérile à usage unique ou autoclavable	Possibilité d'utiliser des bouteilles plastiques d'eau minérale non usagées			100
Kit de lavage de main ou de désinfection de main				2
Glacière de transport 50 ou 60 litre				2
Gant jetable				500
Pain de glace				10
ANALYSE LABORATOIRE				
Pipette pasteur plastique	VWR	612-1702	boite de 250	2
Pipette Pasteur verre	VWR	612-0914	Boite de 1000	1
Micropipette 20 - 200µl	VWR	613-5265	1 micropipette	2
Cone de 250 µl	VWR	613-0248	boite de 960 cones	1
Tube Corning de 50 ml stéril	Grosseron		500 tubes	1
Erlenmeyer 150ml	VWR	214-1132	vendu par	1
Sac autoclave			500	1
API 20 E (catalogue)	BioMérieux France 5, rue des Aqueducs BP 10 - 69290 Craponne renseignements commerciaux et commandes Tél : 0 820 22 3000 Fax : 0 820 22 5000 assistance technique réactifs et équipements. Tél : 0 820 22 9090	20190 Catalogue analytique API 20		1
Huile de paraffine		70100 Huile de paraffine 1 x 125 ml		2
Api20E (galerie)			boite de 25 galerie	4
API 20E (réactifs)				4
Réactif coloration de Gram				2
Tryptone sel si besoin de diluant	AES l.noel@aeschemunex.com	AEB 611494	10 (6 bouteilles de 90ml)	10
Eau peptonée Alkaline (500g)	Oxoid s.a. 6 Route de Paisy BP13 69571 Dardilly Cedex France Tel: 0033 4 72 52 33 70 Tel: 0033 4 72 52 33 84 commercial IDF myriam.mosse@thermofisher.com Fax: 0033 4 78 66 03 76 Email: oxoid.fr@thermofisher.com			2
Gélose Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose (500g)				2
Peptone bactériologique LP 0037b				1
Gélose Nutritive Agar			500g	1
Gélose glucosée à l'extrait de levure appelée "Plate Count Agar" PCA (500g)				2
Vibrio cholerae 01 Polyvalent Antiserum, 1 mL + lames de microscope	Biorad Bio-Rad France Service Commandes Bio-Recherche Tél commercial: 06 08 37 71 30 MrJoulain, secrétariat commercial: 01 47 95 60 00 (cellule des marché) industrie environnement 0147956294 0810122189 fax: 01 47 95 61 35	57142 Vibrio cholera 01 plyvalent Antiserum 1ml	flacon 1ml pour 10 test environ	10
Oxydase disque		53832 Oxydase disque	boite de 30	10

j. Calibrage de la méthode quantitative

Calibrage de la méthode quantitative à l'aide de solutions titrées et de standard Mc Farland



k. Planning hebdomadaire du programme d'analyse

	Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi	Vendredi
Matin	Réception, référencement et stockage des échantillons préparation des équipements et des milieux de cultures pour la semaine	**3.** Transfert du surnageant sur milieu de culture sélectif TCBS , (2 heures) **4.** Incubation 24 h à 37 °C (si positif macroscopique lancer un manip quantitative)	**5.** Reprise des **colonies bien isolées d'aspect plates, lisses et de couleur jaunes** sur TCBS et ré-isolement sur PCA (2 heures) **6.** Incubation 24 h à 37 °C	**7.** Identification de trois colonies différentes sur PCA par boite positive: -GRAM -OXYDASE -test rapide choléra -séro agglutination -si atypique API 20 E (en dernier recours) (3 h00)	Destruction des boites de petri par autoclavage Nettoyage et préparation du laboratoire
	Saisie infos suivi dans cahier de paillasse	Saisie infos suivi dans cahier de paillasse	Saisie infos suivi dans cahier de paillasse	Saisie infos suivi dans cahier de paillasse	Saisie infos suivi dans cahier de paillasse
Après-midi	**1.** Filtration des échantillons d'eau et mise en milieu d'enrichissement (3 heures) **2.** Incubation 16h à 30° C	**Préparation des équipement et des milieux de culture pour la semaine**	**1 bis.** Encemencement des milieux TCBS avec 3 filtres (par échantillon) en parallèle âpres filtration de 100 ou 200, 500 ml sur l'échantillon positif (2 heures) **2 bis.** Incubation 24h à 37°C	**3 bis.** Lecture des filtres (comptage de toutes les bactéries suspectes) (1 heure) 4 **bis.** Ré-isolement de 3 colonies représentatives sur PCA (2 heures) **5 bis.** Incubation 24h à 37°C	différente sur PCA par boite positive: -GRAM -OXYDASE -test rapide choléra -séro agglutination -si atypique API 20 E (en dernier recours) (2 heures)
	Saisie infos suivi dans cahier de paillasse	Saisie infos suivi dans cahier de paillasse	Saisie infos suivi dans cahier de paillasse	Saisie infos suivi dans cahier de paillasse	Saisie infos suivi dans cahier de paillasse

Méthode qualitative
Méthode quantitative
Préparation et saisie de résultats